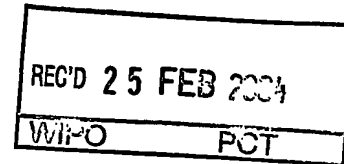


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP 03/14880

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 00 500.5

Anmeldetag: 08. Januar 2003

Anmelder/Inhaber: BASF Aktiengesellschaft,
Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Konservierung und/oder Lagerung von
Zellen mit Nitrilase oder Nitrilhydratase-Aktivität

IPC: C 12 N 1/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 11. Dezember 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**BEST AVAILABLE COPY**

Patentansprüche

1. Verfahren zur Konservierung und/oder Lagerung von Mikroorganismen, die mindestens eine Nitrilhydratase- oder Nitrilase-Enzymaktivität aufweisen, wobei die Konservierung und/oder Lagerung in einem wässrigen Medium erfolgt, welches mindestens ein Aldehyd umfasst, wobei die Gesamtaldehydkonzentration in einem Bereich von 0,1 bis 100 mM/l liegt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Konservierungsschritt durchgeführt wird, bevor die Zellen mit einem Reaktanten, dessen Reaktion durch die Zellen zu katalysieren ist, versetzt werden.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei das wässrige Medium eine Gesamtkonzentration an Cyanidverbindungen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Nitrilen, Blausäure und Cyanidsalzen, enthält, die maximal 10 Mol-% der Gesamtaldehydkonzentration beträgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Aldehyd durch die allgemeinen Formel III beschrieben ist
- $$\begin{array}{c} \text{R}^6\text{-C=O} \\ | \\ \text{H} \end{array} \quad (\text{III})$$
- wobei R^6 substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C1-C10-Alkyl-, C2-C10-Alkenyl-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl- oder Hetaryl- sein kann.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Aldehyd ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend unsubstituierten Benzaldehyd und substituierte Benzaldehyde.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Mikroorganismus ausgewählt ist aus den Arten der Enterobacteriaceae oder Nocardiaceae Familie.

2

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der Mikroorganismus ausgewählt ist aus den Gruppe der Arten Pseudomonas, Burkholderia, Nocardia, Acetobacter, Gluconobacter, Corynebacterium, Brevibacterium, Bacillus, Clostridium, Cyanobacter, Staphylococcus, Aerobacter, Alcaligenes, Rhodococcus und Penicillium.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Verfahren mit mindestens einem weiteren Verfahren zur Stabilisierung, Konservierung und/oder Lagerung von Enzymen kombiniert wird, wobei besagte Verfahren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus:
- a) Zusatz von mindestens einem anorganischen Salz in einer Konzentration von mindestens 100 mM;
 - b) Zusatz von Metallsalzen, deren Metallkation als prosthetische Gruppe der Nitrilase und/oder Nitrilhydratase fungiert;
 - c) Zusatz von Nitrilen und/oder Amiden.
9. Zubereitung von Mikroorganismen, die mindestens eine Nitrilhydratase- oder Nitrilase-Enzymaktivität aufweisen, wobei die Zubereitung umfasst
- a) mindestens ein Aldehyd mit einer Gesamtaldehydkonzentration in einem Bereich von 0,1 bis 100 mM/l, und
 - b) Cyanidverbindungen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Nitrilen, Blausäure und Cyanidsalzen, in einer Gesamtkonzentration, die maximal 10 Mol-% der Gesamtaldehydkonzentration beträgt.
10. Zubereitung von Mikroorganismen nach Anspruch 9, wobei besagte Zubereitung keine Zusätze an Cyanidverbindungen enthält.
11. Verwendung einer Zubereitung von Mikroorganismen nach Anspruch 9 oder 10 zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.
12. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen, Enzymen oder Feinchemikalien unter Verwendung einer Zubereitung von Mikroorganismen nach Anspruch 9 oder 10 oder einer Präparationen derselben.

3

13. Verfahren zur Herstellung von Carbonsäuren und/oder Amide umfassend nachfolgende Schritte:

- 5
- a) Kultivierung eines Mikroorganismus, der mindestens eine Nitrilhydratase- oder Nitrilase-Enzymaktivität aufweist,
- b) Zugabe eines mindestens eines Aldehydes, wobei die Gesamtaldehydkonzentration in einem Bereich von 0,1 bis 100 mM/l liegt,
- 10
- c) Inkontaktbringen der mit Aldehyd versetzten Zubereitung besagter Mikroorganismen mit mindestens einem Nitril und Umsetzung des besagten Nitrils zu einer Carbonsäure und/oder einem Amid.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45

Verfahren zur Konservierung und/oder Lagerung von Zellen mit Nitrilase oder Nitrilhydratase-Aktivität

5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Konservierung und/oder Lagerung von Mikroorganismen, die mindestens eine Nitrilhydratase- oder Nitrilase-Enzymaktivität aufweisen, wobei die Konservierung und/oder Lagerung in einem wässrigen Medium erfolgt, welches mindestens ein Aldehyd umfasst, wobei die Gesamtaldehydkonzentration in einem Bereich von 0,1 bis 100 mM/l liegt.

Durch Mikroorganismen hergestellte Enzyme finden als Biokatalysatoren zunehmend Anwendung in chemischen Produktionsverfahren. Insbesondere die enzymatische Hydrolyse von Nitrilen zu Amiden, Carbonsäuren oder α -Hydroxycarbonsäuren ist ein Verfahren von hoher wirtschaftlicher Bedeutung. Nitril-hydrolysierende Enzyme lassen sich in die Familie der Nitrilhydratasen und die Nitrilasen unterteilen. Nitrilhydratasen und Nitrilasen besitzen im aktiven Zentrum ein Cysteinmolekül das für die Katalyse essentiell ist (Levy-Schil (1995) Gene 161:15-20). Die Nitrilhydratasen katalysieren die Addition von einem Moläquivalent Wasser zu den entsprechenden Amiden. Nitrilasen katalysieren die Addition von zwei Moläquivalenten Wasser zu den entsprechenden Carbonsäuren. In der Regel bewirken besagte Enzyme eine optisch-selektive Hydratation bzw. Hydrolyse, was zu optisch-aktiven (chiralen) Produkten führt. Chirale Carbonsäuren sind gesuchte Verbindungen für die organische Synthesechemie. Sie sind Ausgangsprodukte für eine Vielzahl von pharmazeutischen Wirkstoffen oder Wirkstoffen für den Pflanzenschutz. Chirale Carbonsäuren können zur klassischen Racematspaltung über Diastereomeresalze verwendet werden. So wird R-(-)- oder S-(-)-Mandelsäure beispielsweise zur Racematspaltung racemischer Amine eingesetzt. R-(-)-Mandelsäure wird außerdem als Zwischenprodukt bei der Synthese genutzt.

Üblicherweise werden für die enzymatischen Umsetzungen gereinigte oder teilgereinigte Enzyme, aber auch Mikroorganismen mit entsprechenden Enzymaktivitäten eingesetzt. Die Enzyme können natürlichen oder rekombinanten Ursprungs sein. In der Regel erfolgt die Herstellung (Expression) der Enzyme in einem der Umlagerung vorgelagerten Schritt. Dabei ist es wünschenswert, größere Enzymmengen herzustellen und je nach Bedarf in den katalytischen Prozess einzubringen. Dies macht jedoch eine Lagerung unter Erhalt der Enzymaktivität erforderlich. Kühlung und/oder Einfrieren sind dabei Standardverfahren. Einfrieren erfordert jedoch meist komplexe Gefrier/Tau-Verfahren und geht in der Regel mit einem gra-

2

vierenden Verlust von Enzymaktivität einher. Kühlung im allgemeinen ist mit logistischem Aufwand und Energiekosten verbunden.

EP-A1 0 666 320 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von α -Hydroxysäuren/amiden aus dem korrespondierenden Nitril, wobei vor der Reaktion die verwendeten Mikroorganismen in Gegenwart von Natriumsulfit (1 M) und Phosphatpuffer (50 mM) inkubiert werden. Zudem kann während der Reaktion die Enzymaktivität durch Zugabe von Phosphit oder Hypophosphit weiter stabilisiert werden, wobei besagte Zusätze eine Komplexierung von freiem, enzym-inhibierenden Aldehyd bewirken. EP-A1 0 610 048 beschreibt ein mikrobielles Verfahren zur Herstellung von α -Hydroxysäuren, wobei die Enzymaktivität während der Reaktion durch Zugabe von Natriumsulfit stabilisiert wird, welches ebenfalls eine Komplexierung von freiem, enzym-inhibierenden Aldehyd bewirkt. Bei besagten Verfahren werden die Zusätze durchweg während der Umsetzung des Nitrils zugegeben. Verfahren zur Stabilisierung vor dem Einsatz in der Reaktion sind nicht offenbart.

20 Die typische Methode für die Erhaltung cystein-abhängiger Aktivitäten ist ein Zusatz von Dithiothreitol und/oder Mercaptoethanol und/oder Ethylendiamintetraessigsäure (Beispiel: Nitrilase aus *Rhodococcus rhodochrous* J1; Kobayashi M (1989) Eur J Biochem 182: 349-356).

25

Die Stabilisierung von Nitrilase aus *Rhodococcus* sp. ATCC 39484 wurde durch den Zusatz von Substrat (Benzonitril) erreicht (Stevenson DE (1992) Biotechnol Appl Biochem 15:283-302). Für Nitrilase aus *Rhodococcus rhodochrous* NCIB 11216 sind neben der Substratkonzentration ein basischer pH, die Temperatur und die Enzymkonzentration für die Geschwindigkeit der Stabilisierung verantwortlich (Harper BH (1976) Biochem Soc Trans 4:502-504; Harper BH (1977) Biochem J 165:309-319). Nachteilig ist hier, dass der Stabilisator durch das Enzym umgesetzt wird und so mit der Zeit seine Wirkung verliert.

Für die Nitrilase aus *Rhodococcus rhodochrous* J1 wurde der Zusatz von anorganischen Salzen (u.a. bis 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) und Alkoholen (bis 50% Glycerin, 10% Ethanol) zur Stabilisierung der Enzymaktivität beschreiben (Nagasawa T (2000) Eur J Biochem 267:138-144).

Für die Nitrilase aus *Alcaligenes faecalis* JM3 wurde der Zusatz von 60% Ammoniumsulfat, 2M NaCl oder 30% Propandiol zur Stabilisierung der Enzymaktivität beschreiben (Nagasawa T (1990) Eur J Biochem 194:765-772).

3

EP-A1 0 707 061 beschreibt Verfahren zur Stabilisierung von Nitrilase enthaltenen Zellen durch den Zusatz von anorganische Salzen (Phosphate, Borate, Sulfate, Sulfite, Hydrochloride) zum Lagerpuffer mit einer Konzentration von mindestens 100 mM bis zur Sättigungsgrenze.

US 4,931,391, EP-A1 0 243 967 und US 4,900,672 beschreiben die Stabilisierung einer Nitrilhydratase-Aktivität durch den Zusatz von Amiden oder Carbonsäuren (oder eine Kombination der Substanzen) zur Zellsuspension.

US 4,343,900 beschreibt ein Verfahren zur Produktion von Acrylamid aus Acrylnitril, wobei der Reaktionsmischung Alkalimetallcarbonate zugesetzt werden, um den Aktivitätsverlust beim Quellen der eingesetzten fixierten Zellen zu vermeiden.

US 6,251,646 und US 6,368,804 beschreiben Verfahren zur Stabilisierung von Nitrilaseaktivität-tragenden Mikroorganismen durch Zusatz von Ammonium-, Natrium- oder Kalium(hydrogen)carbonaten in Konzentrationen von mindestens 0,1 M bis zur Sättigungskonzentration.

Aldehyde werden aufgrund der reaktiven Aldehydgruppe als Enzym-inhibieren Substanzen eingestuft. Ihre inhibierende Wirkung auf Nitrilasen während des Produktionsprozesses wird in zahlreichen Veröffentlichungen hervorgehoben (EP-B1 0 773 297 B1, S.4 Absätze [0013] und [0025]; EP-B1 0 707 061 B1, S.2 Absatz [0005]; EP-B1 0 666 320, S.2 Absatz [0004] und dort zitierte Literaturstellen; EP-A2 0 486 289 S.2 Zeile 30 und dort zitierte Literaturstellen; Yamamoto (1992) J Ferm Technol 73:425-430, insbesondere S.429 letzter Absatz).

Die Deaktivierung der Nitrilase / Nitrilhydratase-Aktivität bei der Lagerung ist ein wesentlicher Kostenfaktor bei der industriellen Nutzung besagter Enzyme. Die Aktivität nimmt beispielsweise bei 4°C und pH 6,0 über einen Zeitraum von 6,6 Tagen um 36 % ab, was einen Aktivitätsverlust von 5,5 % pro Tag bedeutet (vgl. Fig. 1; Vergleichsversuch in Beispiel 3). Ein Aktivitätsverlust bei Nitrilasen kann z.B. auf einen Zerfall des Enzymmultimers in seine Monomere beruhen, die keine Nitrilaseaktivität besitzen (Nagasawa T (1990) Eur J Biochem 194:765-772). Die beschriebenen Verfahren sind nur sehr begrenzt in der Lage dieses Problem zu lösen. Zudem nutzen besagte Verfahren hohe Konzentrationen an Zusatzstoffen für eine Stabilisierung der Biokatalysatoren, die zudem nach Verwendung des Biokatalysators aufwendig abgetrennt und entsorgt werden müssen.

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe bestand demnach darin, ein Verfahren bereitzustellen, dass eine möglichst langanhaltende Stabilisierung einer Nitrilase / Nitrilhydratase Aktivität ermöglicht ohne das Reaktionsgemisch mit unerwünschten Begleitstoffen zu kontaminieren.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird diese Aufgabe gelöst.

Ein erster Schritt der Erfindung betrifft Verfahren zur Konservierung und/oder Lagerung von Mikroorganismen, die mindestens eine Nitrilhydratase- oder Nitrilase-Enzymaktivität aufweisen, wobei die Konservierung und/oder Lagerung in einem wässrigen Medium erfolgt, welches mindestens ein Aldehyd umfasst, wobei die Gesamtaldehydkonzentration in einem Bereich von 0,1 bis 100 mM/l liegt.

Besagter Konservierungsschritt wird bevorzugt durchgeführt, bevor die Zellen mit einem Reaktanten, dessen Reaktion durch die Zellen zu katalysieren ist, versetzt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das wässrige Medium eine Gesamtkonzentration an Cyanidverbindungen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Nitrilen, Blausäure und Cyanidsalzen, die maximal 10 Mol-% der Gesamtaldehydkonzentration beträgt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält das zur Konservierung und/oder Lagerung geeignete wässrige Medium keine Zusätze an besagten Cyanidverbindungen.

Der Begriff "Aldehyd" ist breit zu verstehen und umfasst sowohl aliphatische als auch aromatische Aldehyde. In einer bevorzugten Ausführungsform meint Aldehyd Verbindungen der allgemeinen Formel III:

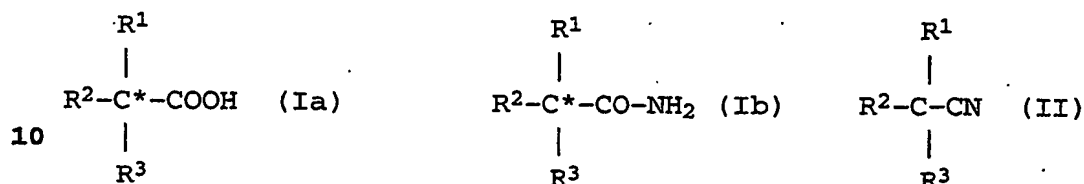


H

wobei R⁶ substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C1-C10-Alkyl-, C2-C10-Alkenyl-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl- oder Hetaryl- sein kann. Besonders bevorzugt sind aromatische Aldehyde, ganz besonders bevorzugt unsubstituierter Benzaldehyd und substituierte Benzaldehyde, wie beispielsweise o-Chlorbenzaldehyd, m-Chlorbenzaldehyd, p-Chlorbenzaldehyd, o-Brombenzaldehyd, m-Brombenzaldehyd, p-Brombenzaldehyd, o-Methylbenzaldehyd, m-Methylbenzaldehyd, p-Methylbenzaldehyd.

5

Die konservierten/gelagerten Mikroorganismen können beispielsweise zur Umsetzung von racemischen Nitrilen der allgemeinen Formel (II) zu chiralen Carbonsäuren der allgemeinen Formel (Ia) oder chiralen Amiden der Allgemeinen Formel (Ib) eingesetzt werden:



* ein optisch aktives Zentrum

- 15 R^1 , R^2 , R^3 unabhängig voneinander Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C1-C10-Alkyl-, C2-C10-Alkenyl-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl-, Hetaryl-, OR^4 oder NR^4R^5 und wobei die Reste R^1 , R^2 und R^3 immer unterschiedlich sind,
- 20 R^4 Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C1-C10-Alkyl-, C2-C10-Alkenyl-, C1-C10-Alkylcarbonyl-, C2-C10-Alkenylcarbonyl-, Aryl-, Arylcarbonyl-, Hetaryl- oder Hetarylcarbonyl-,
- 25 R^5 Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C1-C10-Alkyl-, C2-C10-Alkenyl-, Aryl- oder Hetaryl-.
- 30 Als Nitril am meisten bevorzugt sind Mandelonitril, o-Chlormandelonitril, p-Chlormandelonitril, m-Chlormandelonitril, o-Brommandelonitril, p-Brommandelonitril, m-Brommandelonitril, o-Methylmandelonitril, p-Methylmandelonitril oder m-Methylmandelonitril. Als chirale Carbonsäure sind am meisten bevorzugt R-Mandelsäure, S-Mandelsäure, R-p-Chlormandelsäure, S-p-Chlormandelsäure, R-m-Chlormandelsäure, S-m-Chlormandelsäure, R-o-Chlormandelsäure, S-o-Chlormandelsäure, S-o-Brommandelsäure, S-p-Brommandelsäure, S-m-Brommandelsäure, S-o-Methylmandelsäure, S-p-Methylmandelsäure, S-m-Methylmandelsäure, R-o-Brommandelsäure, R-p-Brommandelsäure, R-m-Brommandelsäure, R-o-Methylmandelsäure, R-p-Methylmandelsäure oder R-m-Methylmandelsäure.

Werden als Edukt für die angestrebte Nitrilase/Nitrilhydratase katalysierte Umsetzung α -Hydroxynitrile der allgemeinen Formel (IV) eingesetzt (wobei für R^6 die gleiche Definition wie in der allgemeinen Formeln III gilt),

6



- 5 so ist der zur Konservierung/Lagerung eingesetzte Aldehyd bevorzugt der gleiche Aldehyd, der durch Umsetzung mit Blausäure oder Cyanid besagtes α -Hydroxynitril ergibt, d.h. der Rest R^6 in den allgemeinen Formeln III und IV ist bevorzugt identisch gewählt.
- 10 Die Gesamtkonzentration an Aldehyden in dem zur Konservierung und/oder Lagerung geeignete wässrige Medium beträgt 0,1 bis 100 mM/l, bevorzugt 0,2 bis 50 mM/l, besonders bevorzugt 0,5 bis 10 mM/l, ganz besonders bevorzugt 0,3 bis 5 mM/l, am meisten bevorzugt 0,4 bis 2 mM/l.
- 15 Das wässrige Medium kann einen neutralen, schwach basischen oder schwach sauren pH-Wert annehmen. Entsprechend liegt der pH in einem Bereich von pH 6 bis 8, bevorzugt pH 6,5 bis 7,5. Die Konservierungstemperatur liegt bevorzugt in einem Bereich von 0 bis
- 20 40°C, besonders bevorzugt 1 bis 10°C, ganz besonders bevorzugt 2 bis 5°C.
- Das erfindungsgemäße Verfahren erwies sich sowohl unter Labor- als auch unter Produktionsbedingungen als außerordentlich geeignet, eine langanhaltende Enzymaktivität zu gewährleisten. Der Biokatalysator zeigt keine Deaktivierung innerhalb der beobachteten
- 25 37 Tage.
- "Mikroorganismus" meint im Rahmen dieser Erfindung gram-positive
- 30 oder gram-negative Bakterien.
- Bevorzugt sind alle Gattungen und Arten der Enterobacteriaceae oder Familien und der Ordnung Actinomycetales, ganz besonders bevorzugt die Enterobacteriaceae Arten Escherichia, Serratia,
- 35 Proteus, Enterobacter, Klebsiella, Salmonella, Shigella, Edwardsiella, Citrobacter, Morganella, Providencia und Yersinia.
- Ferner bevorzugt sind die Arten Pseudomonas, Burkholderia, Nocardioidia, Acetobacter, Gluconobacter, Corynebacterium, Brevibacterium,
- 40 Bacillus, Clostridium, Cyanobacter, Staphylococcus, Aerobacter, Alcaligenes, Rhodococcus und Penicillium.
- Am meisten bevorzugt sind Escherichia Arten, insbesondere Escherichia coli.

45

- Während des erfindungsgemäßen Verfahrens kann der Mikroorganismus in einem wachsenden, ruhenden, immobilisierten oder aufgeschlossenen Zustand vorliegen. Unter aufgeschlossenen Zellen sind beispielsweise Zellen zu verstehen, die über eine Behandlung mit
- 5 beispielsweise Lösungsmitteln durchlässig gemacht worden sind, oder Zellen die über eine Enzymbehandlung, über eine mechanische Behandlung (z. B. French Press oder Ultraschall) oder über eine sonstige Methode aufgebrochen wurden. Die so erhaltenen Rohextrakte sind für das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhaft geeignet.
- 10 Auch partiell oder vollständig gereinigte Enzympräparationen können für das Verfahren verwendet werden. Ebenfalls geeignet sind immobilisierte Mikroorganismen oder Enzyme, die vorteilhaft in der Reaktion Anwendung finden können. Die Immobilisierung kann beispielsweise durch Zugabe eines oder mehrerer Acrylmonomere
- 15 (wie z.B. Acrylamid, Acrylsäure, Methacrylamid, Methacrylsäure, N,N-Dimethylacrylamid, N,N-Diethylacrylamid, Dimethylaminopropylacrylat, Dimethylaminopropylmethacrylat, Dimethylaminopropylacrylamid, Dimethylaminopropylmethacrylamid, Diethylaminopropylacrylamid oder Diethylaminopropylmethacrylamid) sowie gegebenenfalls
- 20 einem oder mehrerer Vernetzern (wie z.B. Methylenbisacrylamid, Methylenbismethacrylamid, 1,2-Dihydroxyethylenbisacrylamid oder Bisacrylamidoessigsäure) zu der Zell- oder Enzympräparation und anschließende radikalische Polymerisation (initiiert durch z.B. Ammoniumpersulfate) realisiert werden.
- 25 Um einen Befall mit Fremdbakterien oder Pilzen zu verhindern können der Konservierungs/Lagerlösung gegebenenfalls geeignete Wirkstoffe mit antibakterieller oder fungizider Wirkung oder andere Salze wie z.B. Ethylenediaminetetraessigsäure zugesetzt werden.
- 30 Die in erfindungsgemäßen Verfahren zum Einsatz kommenden Mikroorganismen können - vor der Konservierung/lagerung - in einem Medium, dass das Wachstum dieser Organismen ermöglicht, gezüchtet werden. Dieses Medium kann ein synthetisches oder ein natürliches
- 35 Medium sein. Je nach Organismus werden dem Fachmann bekannte Medien verwendet. Für das Wachstum der Mikroorganismen enthalten die verwendeten Medien eine Kohlenstoffquelle, eine Stickstoffquelle, anorganische Salze und gegebenenfalls geringe Mengen an Vitaminen und Spurenelemente.
- 40 Vorteilhafte Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Polyole wie Glycerin, Zucker wie Mono-, Di- oder Polysaccharide wie Glucose, Fructose, Mannose, Xylose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Laktose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose,
- 45 komplexe Zuckerquellen wie Melasse, Zuckerphosphate wie Fructose-1,6-bisphosphat, Zuckeralkohole wie Mannit, Alkohole wie Methanol oder Ethanol, Carbonsäuren wie Citronensäure, Milchsäure

oder Essigsäure, Fette wie Sojaöl oder Rapsöl, Aminosäuren wie ein Aminosäurengemisch beispielsweise sog. Casamino acids (Difco) oder einzelne Aminosäuren wie Glyzin oder Asparaginsäure oder Aminozyucker, die letztgenannten können auch gleichzeitig als Stickstoffquelle verwendet werden. Besonders bevorzugt sind Polyole, insbesondere Glycerin.

Vorteilhafte Stickstoffquellen sind organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispiele sind Ammoniumsalze wie NH_4Cl oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Nitrate, Harnstoff, oder komplexe Stickstoffquellen wie Maisquellwasser, Bierhefeautolysat, Sojabohnenmehl, Weizengluten, Hefeextrakt, Pepton, Fleischextrakt, Caseinhydrolysat, Hefe oder Kartoffelprotein, die häufig auch gleichzeitig als Stickstoffquelle dienen können.

Beispiele für anorganische Salze sind die Salze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Mangan, Kalium, Zink, Kupfer und Eisen. Als Anion dieser Salze sind besonders das Chlor-, Sulfat- und Phosphation zu nennen. Ein wichtiger Faktor zur Steigerung der Produktivität im erfindungsgemässen Verfahren ist die Kontrolle der Fe^{2+} - oder Fe^{3+} -Ionenkonzentration im Produktionsmedium.

Gegebenenfalls werden dem Nährmedium weitere Wachstumsfaktoren zugesetzt, wie beispielsweise Vitamine oder Wachstumsförderer wie Biotin, 2-KLG, Thiamin, Folsäure, Nicotinsäure, Pantothenat oder Pyridoxin, Aminosäuren wie Alanin, Cystein, Prolin, Asparaginsäure, Glutamin, Serin, Phenylalanin, Ornithin oder Valin, Carbonsäuren wie Citronensäure, Ameisensäure, Pimelinsäure oder Milchsäure, oder Substanzen wie Dithiothreitol.

Das Mischungsverhältnis der genannten Nährstoffe hängt von der Art der Fermentation ab und wird im Einzelfall festgelegt. Die Mediumkomponenten können alle zu Beginn der Fermentation vorgelegt werden, nachdem sie falls erforderlich getrennt sterilisiert oder gemeinsam sterilisiert wurden, oder aber je nach Bedarf während der Fermentation kontinuierlich oder diskontinuierlich nachgegeben werden.

Die Züchtungsbedingungen werden so festgelegt, dass die Organismen so wachsen, dass die bestmöglichen Ausbeuten (zu ermitteln beispielsweise durch die Aktivitätsmenge des exprimierten rekombinanten Proteins) erreicht werden. Bevorzugte Züchtungstemperaturen liegen bei 15°C bis 40°C . Besonders vorteilhaft sind Temperaturen zwischen 25°C und 37°C . Vorzugsweise wird der pH-Wert in einem Bereich von 3 bis 9 festgehalten. Besonders vorteilhaft sind

9

pH-Werte zwischen 5 und 8. Im allgemeinen ist eine Inkubationsdauer von wenigen Stunden bis zu einigen Tagen bevorzugt von 8 Stunden bis zu 21 Tagen, besonders bevorzugt von 4 Stunden bis 14 Tagen ausreichend.

5

Wie Medien vorteilhaft optimiert werden können, kann der Fachmann beispielsweise dem Lehrbuch Applied Microbiol Physiology, "A Practical Approach (Eds. PM Rhodes, PF Stanbury, IRL-Press, 1997, S.53-73, ISBN 0 19 963577 3) entnehmen.

10

Der Aldehyd kann zur Konservierung/Lagerung vor, während oder nach der Züchtung der Mikroorganismen zugesetzt werden. So ist es beispielsweise möglich einen maximalen Erhalt der Aktivität zu erreichen, indem der Aldehyd dem Fermentationsansatz - ohne wei-

15 tere Separation der Mikroorganismen - zugesetzt wird.

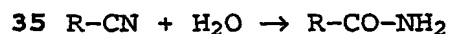
Es ist jedoch ebenfalls möglich, die so gezüchteten mikrobiellen Zellen oder Mikroorganismen beispielsweise durch Zentrifugation von dem Kulturmedium zu separieren, optional ein oder mehrmals mit einem geeigneten Puffer (wie z.B. Borat- oder Phosphatpuffer) zu waschen und anschließend zur Lagerung/Konservierung in der wässrigen Lösung, die mindestens ein Aldehyd umfassen, aufzunehmen bzw. zu bzw. resuspendieren. Die Konzentration der Mikroorganismen kann in besagter wässrigen Lösung umfassend mindestens ein

25 Aldehyd beliebig gewählt werden.

Die Mikroorganismen, die im Rahmen der Erfindung zum Einsatz kommen weisen mindestens eine Nitrilhydratasae und/oder Nitrilase-Aktivität auf.

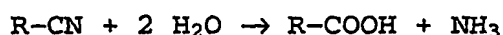
30

"Nitrilhydratase"-Aktivität meint allgemein die Eigenschaft, die Addition von einem Moläquivalent Wasser an ein Nitril zu dem entsprechenden Amid zu katalysieren:



Nitrilhydratasen umfassen bevorzugt Enzyme der EC-Klasse 4.2.1.84 (Nitrilhydratasen).

40 "Nitrilase"-Aktivität meint allgemein die Eigenschaft, die Addition von zwei Moläquivalenten Wasser an ein Nitril zu der entsprechenden Carbonsäure zu katalysieren:



45

10

Nitrilasen umfassen bevorzugt Enzyme der EC-Klassen 3.5.5.1 (Nitrilasen), 3.5.5.2 (Ricininnitrilase), 3.5.5.4 (Cyanoalaninnitrilasen), 3.5.5.5 (Arylacetonitrilasen), 3.5.5.6 (Bromoxynilnitrilasen), 3.5.5.7 (Aliphatische Nitrilasen).

5

Die Nitrilase und/oder Nitrilhydratase-Aktivität der besagten Mikroorganismen Zellen kann natürlichen oder rekombinanten Ursprungs sein.

- 10 "Natürlichen Ursprungs" meint dabei, dass der Mikroorganismus als solcher - ohne eine durch menschliches Handeln bewirkte genetische Änderung - eine entsprechende Nitrilase und/oder Nitrilhydratase-Aktivität aufweist. Zahlreiche derartiger Mikroorganismen sind dem Fachmann bekannt. Bevorzugt sind insbesondere Mikroorganismen der Gattungen *Rhodococcus* und *Gordona*, wie beispielsweise *Rhodococcus* sp. HT40-6 (FERM BP-5231), *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 33278, *Rhodococcus rhodochrous* J-1 (FERM BP-1478), *Gordona terrae* MA-1 (FERM BP-4535) (JP-A-4-222591, JP-B-6-55148, EP-A1 0 707 061).

20

- "Rekombinanten Ursprungs" meint dabei, dass die DNA-Sequenz kodierend für ein Enzym mit Nitrilase und/oder Nitrilhydratase-Aktivität aus einem Mikroorganismus isoliert und in einem Mikroorganismus einer anderen Art exprimiert wird. Dem Fachmann sind zahlreiche Sequenzen kodierend für Enzyme Nitrilase und/oder Nitrilhydratase-Aktivität bekannt. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien zu nennen:

1. Nitrilase aus *Acidovorax facilis* 72W (Gavagan JE et al. (1999) Appl Microbiol Biotechnol 52:654-659)
2. Nitrilase aus *Acinetobacter* sp. AK 226 (Yamamoto K und Komatsu K (1991) Agric Biol Chem 55(6):1459-1466)
3. Nitrilase aus *Acinetobacter* sp. RFB1 (Finnegan I et al. (1991) Appl Microbiol Biotechnol 36:142-144)
- 35 4. Nitrilase aus *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 (Yamamoto K et al. (1991) Appl Environ Microbiol 57(10):3028-3032)
5. Nitrilase aus *Alcaligenes faecalis* JM3 (Nagasawa T et al. (1990) Eur J Biochem 194:765-772)
6. Nitrilasen (NIT1/NIT2/NIT3) aus *Arabidopsis thaliana* (Vorwerk S et al. (2001) Planta 212:508-516)
- 40 7. Nitrilase aus *Arthrobacter* sp. J-1 (Bandyopadhyay AK et al. (1986) Appl Environ Microbiol 51(2):302-306)
8. Nitrilase aus *Bacillus pallidus* Dac521 (Cramp R et al. (1997) Microbiology 143:2313-2320)
- 45 9. Nitrilase aus *Comamonas* sp. NI1 (Cerbelaud E et al. (1996) Ind Chem Libr 8:189-200)

11

10. Nitrilase aus *Comamonas testosteroni* sp. (Levy-Schil S et al. (1995) *Gene* 161:15-20)
11. Nitrilase aus *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Goldlust A und Bohak Z (1989) *Biotechnol Appl Biochem* 11:581-601)
- 5 12. Nitrilase aus *Fusarium solani* (Harper BH (1977) *Biochem J* 167:685-692)
13. Nitrilase aus *Klebsiella ozaenae* (McBride KE et al. (1986) *Appl Environ Microbiol* 52(2):325-330)
14. Nitrilase aus *Pseudomonas fluorescenz* DSM 7155 (Layh N et al. (1998) *J Mol Catal B: Enzym* 5:467-474)
- 10 15. Nitrilase aus *Pseudomonas* sp. (Layh N et al. (1992) *Arch Microbiol* 158:405-411)
16. Nitrilase aus *Pseudomonas* sp. (S1) (Dhillon J et al. (1999) *Can J Microbiol* 45: 811-815)
- 15 17. Nitrilase aus *Pseudomonas* sp. 13 (Yanase H et al. (1982) *Agric Biol Chem* 46:2925)
18. Nitrilase aus *Rhodococcus rhodochrous* J1 (Kobayashi M et al. (1989) *Eur J Biochem* 182:349-356)
19. Nitrilase aus *Rhodococcus rhodochrous* K22 (Kobayashi M et al. (1990) *J Bacteriol* 172(9):4807-4815)
- 20 20. Nitrilase aus *Rhodococcus rhodochrous* NCIB 11215 (Harper BH (1985) *Int J Biochem* 17(6):677-683)
21. Nitrilase aus *Rhodococcus rhodochrous* NCIB 11216 (Harper BH (1977) *Biochem J* 165:309-319)
- 25 22. Nitrilase aus *Rhodococcus rhodochrous* PA34 (Bhalla TC et al. (1992) *Appl Microbiol Biotechnol* 37:184-190)
23. Nitrilase aus *Rhodococcus* sp. ATCC 39484 (Stevenson DE et al. (1992) *Biotechnol Appl Biochem* 15:283-302)

30 In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Nitrilase beschrieben durch eine Aminosäuresequenz, die kodiert wird durch eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe

- 35 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,
- 40 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen kodieren und mindestens 35% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen und befähigt sind,
- 45 mindestens ein Nitril zu der entsprechenden Carbonsäure umzusetzen.

12

Die Expression rekombinanter Nitrilasen/Nitrilhydrataseen kann beispielsweise mittels eines geeigneten in den Mikroorganismus eingeführten DNA-Konstruktes realisiert werden. Bevorzugt handelt es sich bei dem DNA-Konstrukt um einen Vektor. Vektoren können
5 beispielhaft Plasmide, Cosmide oder Phagen sein. Bevorzugt ist der Vektor eine zirkuläres Plasmid, das die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz in rekombinanter Form umfasst und zu autonomer Replikation in der prokaryotischen Wirtzelle befähigt ist. Als Vektoren seien beispielhaft zu nennen:

10

- a) in E.coli sind bevorzugt pQE70, pQE60 und pQE-9 (QIAGEN, Inc.); pBluescript Vektoren, Phagescript Vektoren, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene Cloning Systems, Inc.); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia Biotech, Inc.); pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-B1, λ gt11 oder pBdCI,
15
 - b) in Streptomyces sind bevorzugt pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361,
20
 - c) in Bacillus sind bevorzugt pUB110, pC194 oder pBD214,
 - d) in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667,
25
- oder Derivate der vorstehend genannten Plasmide. Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vektors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden.
30

Das DNA-Konstrukt umfaßt mindestens eine zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Enzym mit Nitrilase und/
35 oder Nitrilhydratase-Aktivität in funktioneller Verknüpfung mit einem in den jeweilig verwendeten Mikroorganismus funktionellen Promotor.

Zahlreiche in Mikroorganismen funktionelle Promotoren sind dem
40 Fachmann bekannt: Beispielhaft seien Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, lpp-, lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, rha-, SP6-, λ -PR- oder λ -PL-Promotor zu nennen. Besonders bevorzugt ist der Promotor des Rhamnose-Operons (rha-Promotor) aus E.coli, der durch Zugabe von Rhamnose induziert werden kann.
45

13

- Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man allgemein eine Anordnung in der eine genetische Kontrollsequenz (z.B. ein Promotor) ihre Funktion in Bezug auf die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausüben kann. Funktion kann dabei beispielsweise die
- 5 Kontrolle der Expression d.h. Transkription und/oder Translation der Nukleinsäuresequenz bedeuten. Kontrolle umfasst dabei beispielsweise die Initiierung, Steigerung, Steuerung oder Suppression der Expression d.h. Transkription und ggf. Translation. Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die
- 10 sequentielle Anordnung eines Promoter, der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dem Fachmann sind verschiedene Wege bekannt,
- 15 um zu einem der erfindungsgemässen DNA-Konstrukte zu gelangen. Die Herstellung kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in T Maniatis, EF Fritsch und J Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,
- 20 NY (1989) sowie in TJ Silhavy, ML Berman und LW Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, FM et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.
- 25 Besagtes DNA-Konstrukt kann weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff der Funktionselemente ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen, die Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemässen DNA-
- 30 Konstrukte oder Organismen haben. Funktionselemente gewährleisten, verstärken, regulieren oder modifizieren zum Beispiel die Transkription und Translation in entsprechenden Wirtsorganismen.
- 35 Funktionselemente sind beispielsweise beschrieben bei "Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)" oder "Gruber and Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, eds.: Glick and Thompson, Chapter 7, 89-108" sowie
- 40 den dort aufgewiesenen Zitaten. Je nach nachstehend näher beschriebenen Wirtsorganismus oder Ausgangsorganismus, der durch Einbringen der Expressionskassetten oder Vektoren in einen genetisch veränderten oder transgenen Organismus überführt wird, eignen sich verschiedene Kontrollsequenzen.

14

"Genetische Kontrollsequenzen" umfassen beispielsweise die 5'-untranslatierte Region oder die nichtkodierende 3'-Region von Genen. "Genetische Kontrollsequenzen" meint ferner Sequenzen, die für Fusionsproteine bestehend aus einer Signalpeptidsequenz 5 kodieren. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

a) Selektionsmarker

Selektionsmarker sind in der Regel erforderlich, um erfolgreich transformierte Zellen zu selektionieren und den Verlust des DNA-Konstruktes aus der Wirtszelle im Laufe der Zeit und der Zellteilungen zu verhindern. Ein solcher Verlust kann insbesondere dann auftreten, wenn das durch die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz kodierte rekombinante Protein einen toxischen Effekt auf den prokaryontischen Organismus hat. Der mit dem Expressionskonstrukt eingebrachte selektionierbaren Marker verleiht den erfolgreich transformierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Antibiotikum wie zum Beispiel Ampicillin, Kanamycin oder Hygromycin) verleiht. Beispielhaft als Selektionsmarker seien genannt:

- Amp (Ampicillin-Resistenz; b-Lactamase)
- Cab (Carbenicillin-Resistenz)
- Cam (Chloramphenicol-Resistenz)
- Kan (Kanamycin-Resistenz)
- Rif (Rifampicin-Resistenz)
- Tet (Tetracyclin-Resistenz)
- Zeo (Zeocin-Resistenz)
- Spec (Spectinomycin)

Der Selektionsdruck wird durch entsprechende Mengen des Antibiotikums aufrechterhalten. Beispielhaft seien zu nennen: Ampicillin 100 mg/l, Carbenicillin 100 mg/l, Chloramphenicol 35 mg/l, Kanamycin 30 mg/l, Rifampicin 200 mg/l, Tetracyclin 12,5 mg/l, Spectinomycin 50 mg/l.

Selektionsmarker umfassen ferner solche Gene und Genprodukte, die beispielsweise durch Komplementierung einer genetischen Defizienz in der Aminosäure- oder Nukleotidsynthese, eine Selektion einer entsprechend transformierten Wirtszelle ermöglichen. Dazu werden i.a. Medien eingesetzt, die besagte Aminosäure oder den besagten Nukleotidbaustein nicht enthalten. Verschiedene derartige Systeme sind dem Fachmann bekannt. Beispielhaft seien die Defizienzen in der Tryptophan (z.B. trpC), Leucin (z.B. leuB), Histidin (z.B. hisB) Biosynthese zu nennen, wie sie z.B. im E.coli Stamm KC8 (Clontech) vorliegen. Diese Defizienzen können u.a. durch die

15

selektionierbaren Marker TRP1, L^{eu}2 und HIS3 komplementiert werden.

- b) Transkriptionsterminatoren
5 Der Transkriptionsterminator vermindert eine ungewollte Transkription und erhöht die Plasmid- und mRNA Stabilität.
- c) Shine-Dalgarno Sequenzen
10 Eine Shine-Dalgarno (SD) Sequenz ist erforderlich für die Initiation der Translation und ist komplementär zum 3'-Ende der 16S ribosomalen RNA. Die Effizienz der Initiation der Translation am Start-Kodon hängt von der tatsächlichen Sequenz ab. Eine geeignete Konsensussequenz für E.coli ist beispielhaft: 5'-TAAGGAGG-3'. Sie ist ca. 4 bis 14 Nukleotide
15 stromaufwärts des Startkodons lokalisiert, wobei das Optimum bei 8 Nukleotiden liegt. Um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden (welche die Expression reduzieren können), sollte diese Region bevorzugt reich an A/T-Nukleotiden sein.
- 20 d) Startkodon
Das Startkodon ist der Initiationpunkt der Translation. In E. coli ist ATG das meist genutzte Startkodon; GTG kann alternativ auch genutzt werden.
- 25 e) "Tags" und Fusionsproteins
N- or C-terminale Fusionen der zu exprimierenden rekombinanten Proteine mit kürzeren Peptiden ("Tags") oder anderen Proteinen (Fusionpartnern) können vorteilhaft sein. Sie können
30 beispielsweise eine verbesserte Expression, Löslichkeit, Detektierbarkeit und Aufreinigung ermöglichen. Bevorzugt werden derartige Fusionen mit Protease-Spaltsequenzen (z.B. für Thrombin oder Faktor X) kombiniert, die eine Entfernung des "Tags" bzw. des Fusionspartners nach der Expression und Aufreinigung ermöglichen.
- 35 f) Multiple Klonierungsregionen (Multiple cloning site; MCS) erlauben und erleichtern die Insertion einer oder mehrerer Nukleinsäuresequenzen.
- 40 g) Stop-Kodon / Translationsterminatoren
Von den drei möglichen Stopp-Kodons ist TAA bevorzugt, da es bei TAG und TGA unter Umständen zu einem "Durchlesen" ("Read-Through") ohne Abbruch der Translation kommen kann. Es können
45 auch mehrere Stopp-Kodons infolge eingesetzt werden um eine verlässliche Termination zu gewährleisten.

h) Reportergene

Reportergene kodieren für leicht quantifizierbare Proteine, die über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz, der Expressionshöhe, des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Reportergene können z.B. für nachfolgende Proteine kodieren: Hydrolasen, Fluoreszenzproteine, Biolumineszproteine, Glucosidasen oder Peroxidasen. Bevorzugt sind Luciferasen, β -Galactosidasen, β -Glucuronidase, "Green Fluorescence Protein", Acetyl-, Phospho- oder Adenyltransferasen (siehe auch Schenborn E, Groskreutz D (1999) Mol Biotechnol 13(1):29-44).

Die Herstellung einer transformierten Mikroorganismus erfordert, dass die entsprechende DNA (beispielsweise eine der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren) in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (siehe auch Keown et al. (1990) Methods in Enzymology 185:527-537). So kann die DNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion, Elektroporation oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln (biolistische Verfahren mit der Genkanone "particle bombardment") eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Fusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Als bevorzugte allgemeine Methoden seien zu nennen Calciumphosphat vermittelte Transformation, DEAE-Dextran vermittelte Transformation, kationische Lipid-vermittelte Transformation, Elektroporation, Transduktion, Infektion. Derartige Verfahren sind dem Fachmann geläufig und beispielsweise beschrieben (Davis et al. (1986) Basic Methods In Molecular Biology; Sambrook J et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel FM et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons; Glover DM et al. (1995) DNA Cloning Vol.1, IRL Press ISBN 019-963476-9).

Transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Verschiedene Selektionsmarker sind oben beschrieben.

17

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft eine Zubereitung von Mikroorganismen, die mindestens eine Nitrilhydratase- oder Nitrilase-Enzymaktivität aufweisen, wobei die Zubereitung umfasst

- 5 a) mindestens ein Aldehyd mit einer Gesamtaldehydkonzentration in einem Bereich von 0,1 bis 100 mM/l, und
- b) Cyanidverbindungen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Nitrilen, Blausäure und Cyanidsalzen, in einer Gesamtkonzentration, die maximal 10 Mol-% der Gesamtaldehydkonzentration beträgt.
- 10

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Zubereitung keine Zusätze an besagten Cyanidverbindungen...

15

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen Zubereitung von Mikroorganismen zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien. Feinchemikalien meint bevorzugt Proteine, Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, natürliche und synthetische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe.

20

Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen, Enzymen (bevorzugt Enzymen mit Nitrilase- und/oder Nitrilhydratase-Aktivität) oder anderen Feinchemikalien wie beispielsweise Amiden oder Carbonsäuren (bevorzugt chiraler Carbonsäuren und Amiden) unter Verwendung einer der erfindungsgemäßen Zubereitung von Mikroorganismen oder einer Präparationen derselben.

25

30

Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von Carbonsäuren und/oder Amide (bevorzugt chiraler Carbonsäuren/Amide), umfassend nachfolgende Schritte:

35

- a) Kultivierung eines Mikroorganismus, der mindestens eine Nitrilhydratase- oder Nitrilase-Enzymaktivität aufweist,
- b) Zugabe eines mindestens eines Aldehydes, wobei die Gesamtaldehydkonzentration in einem Bereich von 0,1 bis 100 mM/l liegt,
- 40
- c) Inkontaktbringen der mit Aldehyd versetzten Zubereitung besagter Mikroorganismen mit mindestens einem Nitril und Umsetzung des besagten Nitrils zu einer Carbonsäure und/oder einem Amid.
- 45

18

- In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Zubereitung des Mikroorganismus bei der Zugabe des Aldehydes Cyanidverbindungen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Nitrilen, Blausäure und Cyanidsalzen, in einer Konzentration, die maximal 10 Mol-% der Gesamtaldehydkonzentration beträgt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält besagte Zubereitung keine Zusätze an besagten Cyanidverbindungen. In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform kann die Zubereitung nach der Zugabe des Aldehydes (Schritt b) bis zum Einsatz in dem Reaktionsschritt c) gelagert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren kann kontinuierlich oder diskontinuierlich in batch- oder fed-batch-weise durchgeführt werden. Dabei kann sowohl die Zubereitung der Mikroorganismen als auch das racemische Nitril als Substrat nachgeführt werden.
- 15 Einzelheiten zu der Durchführung der Umsetzungen bzw. zur Aufreinigung der Produkte etc. sind beispielsweise in WO 00/23577 im Detail beschrieben. Auf die dort als beschriebenen Edukte, Produkte und Verfahrensparameter wird ausdrücklich bezug genommen.
- 20 In einer weiteren Ausführungsform, kann das Verfahren mit weiteren Verfahren zur Stabilisierung, Konservierung und/oder Lagerung von Enzymen, insbesondere Nitrilasen und/oder Nitrilhydratase kombiniert werden. Derartige Verfahren können beispielhaft jedoch nicht einschränkend umfassen:
- 25 a) Zusatz von mindestens einem anorganischen Salz (bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Phosphaten, Boraten, Sulfaten, Sulfiten und Hydrochloriden) in einer Konzentration von mindestens 100 mM, bevorzugt 300 bis 700 mM.
- 30 b) Zusatz von Metallsalzen, deren Metall kation als prosthetische Gruppe der Nitrilase und/oder Nitrilhydratase fungiert (z.B. Cobaltchlorid oder Eisensulfat).
- 35 c) Zusatz von Nitrilen (z.B. Benzonitril, Isobutyronitril, Succinonitril) und/oder Amiden (s-Caprolactam, Isobutylamid, Propionamid).

Abbildungen

40

Fig.1: Lagerstabilität einer Nitrilase zur Produktion von (R)-Mandelsäure.

45

Wiedergegeben ist beispielhaft die Abnahme der Aktivität (A; in % der Ausgangsaktivität) von drei unabhängigen Präparationen einer E.coli exprimierten Nitrilase ohne

19

Zusatz von Aldehyd (Vergleichsversuche) über einen Zeitraum von bis zu 20 Tagen (d).

Fig.2: Lagerstabilität einer Nitrilase zur Produktion von (R)-Mandelsäure.

Wiedergegeben ist die Abnahme der Aktivität (A; in % der Ausgangsaktivität) von Präparationen einer E.coli exprimierten Nitrilase ohne Zusatz von 2-Chlorbenzaldehyd (offene Kreise) im Vergleich zu einer ansonsten identischen Präparation mit Zusatz von 2-Chlorbenzaldehyd (geschlossene Kreise). Wiedergegeben ist ein Zeitraum (t) von bis zu 32 Tagen (d).

15 Beispiele

Allgemeine Nukleinsäureverfahren wie z.B. Klonierung, Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Mikroorganismen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wenn nichts anderes beschrieben wurde wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

30 Beispiel 1: Herstellung von Zellen mit Nitrilaseaktivität:

Die Fermentation des *Escherichia coli* (TG10 pDHE1650 pAgro4 pHSG575) erfolgte im 20 L Bioreaktor. Der Reaktor mit 10 l Arbeitsvolumen wurde mit 200 ml Vorkultur aus Schüttelkolben angeimpft. Das Vorkulturmedium entspricht dem Hauptkulturmedium.

Medium:

40 g	Glycerin 99,5 %
15 g	Trypton
40 13,3 g	Kaliumdihydrogenphosphat
5 g	Hefeextrakt
4 g	Di-Ammoniumhydrogenphosphat
1,7g	Citronensäure
1,1 g	Magnesiumsulfat Heptahydrat
45 1 ml	Spurenelementlösung SL Korz 1000 C
0,1 ml	Tego KS 911 Antischaummittel
0,062 g	Eisen(II)sulfat Heptahydrat

20

10 mg Thiaminhydrochlorid
ad 1 l VE-Wasser

Das Medium wird 30 min bei 121°C sterilisiert. Anschließend werden 5 0,1 g Ampicilin steril zugesetzt

Spurenelementlösung

	Citronensäure*H ₂ O		20 g
	Kobalt(II)chlorid Hexachlorid	CoCl ₂ * 6H ₂ O	2,5 g
10	Mangan(II)chlorid Tetrachlorid	MnCl ₂ * 4H ₂ O	3,0 g
	Kupfer(II)chlorid Dihydrat	CuCl ₂ * 2H ₂ O	0,3 g
	Borsäure	H ₃ BO ₃	0,6 g
	Natriummolybdat Dihydrat	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,5 g
	Zinkacetat Dihydrat	Zn(CH ₃ COO) ₂ * 2H ₂ O	2,6 g
15	ad 1L VE- H ₂ O		

Glycerinfeedlösung

	2 L	VE-Wasser
	211 g	Natriumsulfat
20	13,6 g	Eisen(II)sulfat Heptahydrat
	8,8 kg	Glycerin 99,5 %
	220 mL	Spurenelementlösung

Rhamnose-Feedlösung

25	703 g	VE-Wasser
	297 g	Rhamnose Monohydrat

Die Fermentation erfolgt bei einer Temperatur von 37°C. Die Begasung wird zwischen 8-30 L/min, die Rührerdrehzahl von 400-1500

30 1/min geregelt um einen pO₂ von 20 % nicht zu unterschreiten. Nach 1 h Fermentationszeit wird die Kultur mit IPTG (0,15 mM) induziert. Anschließend werden 18.5 g Rhamnosefeedlösung zugesetzt. Nach Verbrauch der vorgelegten Glycerinmenge wird kontinuierlich Glycerin zugefüttert. Nach 44 h Fermentationsdauer werden Zell-

35 suspensionen von 50 g BTM/l und 50 bis 60 kU/l erhalten. Die Zellen werden auf 4°C abgekühlt.

Beispiel 2: Aktivitätstest

40 Zu 880 µl Natrium-Kalium-Phosphatpuffer (10mM) werden 50 µl Zellsuspension pipettiert und auf 30°C temperiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 µl methanolischer Mandelonitrillösung (12 %) gestartet. Nach 10 min wird die Enzymreaktion durch Zugabe von 50 µl 1M HC gestoppt. Die Zellmasse wird abzentrifugiert und die

45 Mandelsäurekonzentration im Überstand wird per HPLC (ODS Hypersil 100*2,0 mm, Laufmittel: 75% H₃PO₄ (14,8 mM) / 25% Methanol; Flußrate: 0,5 ml/min; Injektionsvolumen: 2 µl; Säulentemperatur:

21

40°C; Detektion: 210nm; Retentionzeit Mandelsäure: 0,9 min) gemessen.

Beispiel 3: Lagerung mit Benzaldehyd:

5

Die Zellsuspension wurde 14 h nach Fermentationsende mit NaOH bzw. H₂SO₄ auf einen pH 6,0, 6,6 bzw 7,2 eingestellt und anschließend mit Benzaldehyd versetzt. Die Proben wurden bei 4°C und 22°C gelagert. die Enzymaktivität wurde 0,6, 3,6 und 6,6 Tage nach

10 Fermentationsende bestimmt.

Lagerung bei 22°C:

15		pH-Wert	Lagerzeit		
			0,6 d	3,6 d	6,6 d
			Aktivität in kU/L		
	ohne Zusatz	7,2	51,0	49,0	48,7
	1 mM Benzaldehyd	7,2	55,8	50,4	48,7
	5 mM Benzaldehyd	7,2	47,1	51,7	52,9
20	10 mM Benzaldehyd	7,2	53,8	52,7	51,3
	ohne Zusatz	6,6	51,5	50,5	50,9
	1 mM Benzaldehyd	6,6	53,2	53,0	53,1
	5 mM Benzaldehyd	6,6	47,1	54,3	58,0
25	10 mM Benzaldehyd	6,6	51,3	49,4	55,4
	ohne Zusatz	6,0	54,8	45,6	44,5
	1 mM Benzaldehyd	6,0	55,1	50,6	51,0
	5 mM Benzaldehyd	6,0	51,8	51,5	54,9
30	10 mM Benzaldehyd	6,0	51,3	53,0	49,2

Lagerung bei 4°C:

35		pH-Wert	Lagerzeit		
			0,6 d	3,6 d	6,6 d
			Aktivität in kU/L		
	ohne Zusatz	7,2	51,0	48,6	47,8
	1 mM Benzaldehyd	7,2	55,8	46,8	47,5
	5 mM Benzaldehyd	7,2	47,1	48,3	50,7
40	10 mM Benzaldehyd	7,2	53,8	51,2	49,2
	ohne Zusatz	6,6	51,5	49,5	45,3
	1 mM Benzaldehyd	6,6	53,2	52,3	52,5
	5 mM Benzaldehyd	6,6	47,1	52,0	55,7
45	10 mM Benzaldehyd	6,6	51,3	55,5	51,9
	ohne Zusatz	6,0	54,8	42,8	34,9
	1 mM Benzaldehyd	6,0	55,1	49,9	48,3

22

	pH-Wert	Lagerzeit			
		0,6 d	3,6 d	6,6 d	
		Aktivität in kU/L			
5	5 mM Benzaldehyd	6,0	51,8	52,3	53,0
	10 mM Benzaldehyd	6,0	51,3	51,5	50,2

Beispiel 4: Lagerung mit CBA:

- 10 Die Zellsuspension wurde 14h nach Fermentationsende mit NaOH bzw. H_2SO_4 auf einen pH 6,0, 6,6 bzw 7,2 eingestellt und anschließend mit 2-Chlorbenzaldehyd versetzt. Die Proben wurden bei 4°C und 22°C gelagert. Die Enzymaktivität wurde 0,6, 3,6 und 6,6 Tage nach Fermentationsende bestimmt.

15

Lagerung bei 22°C:

20		pH-Wert	Lagerzeit		
			0,6 d	3,6 d	6,6 d
			Aktivität in kU/L		
	ohne Zusatz	7,2	51,0	49,0	48,7
	1 mM 2-Chlorbenzaldehyd	7,2	51,3	52,8	53,2
	5 mM 2-Chlorbenzaldehyd	7,2	53,3	51,4	50,1
	10 mM 2-Chlorbenzaldehyd	7,2	48,3	52,9	54,0
25					
	ohne Zusatz	6,6	51,5	50,5	50,9
	1 mM 2-Chlorbenzaldehyd	6,6	48,8	55,0	57,2
	5 mM 2-Chlorbenzaldehyd	6,6	50,6	56,7	55,5
	10 mM 2-Chlorbenzaldehyd	6,6	47,4	56,2	58,6
30					
	ohne Zusatz	6,0	54,8	45,6	44,5
	1 mM 2-Chlorbenzaldehyd	6,0	52,4	53,8	54,5
	5 mM 2-Chlorbenzaldehyd	6,0	52,5	55,0	59,1
	10 mM 2-Chlorbenzaldehyd	6,0	53,5	55,7	52,4

35

Lagerung bei 4°C:

40		pH- Wert	Lagerzeit		
			0,6 d	3,6 d	6,6 d
			Aktivität in kU/L		
	ohne Zusatz	7,2	51,0	48,6	47,8
	1 mM 2-Chlorbenzaldehyd	7,2	51,3	48,3	45,2
	5 mM 2-Chlorbenzaldehyd	7,2	53,3	51,2	48,1
	10 mM 2-Chlorbenzaldehyd	7,2	48,3	51,0	49,9
45					
	ohne Zusatz	6,6	51,5	49,5	45,3
	1 mM 2-Chlorbenzaldehyd	6,6	48,8	55,1	54,7
	5 mM 2-Chlorbenzaldehyd	6,6	50,6	56,3	53,6

23

	pH-Wert	Lagerzeit			
		0,6 d	3,6 d	6,6 d	
		Aktivität in kU/L			
5	10 mM 2-Chlorbenzaldehyd	6,6	47,4	55,0	58,5
	ohne Zusatz	6,0	54,8	42,8	34,9
	1 mM 2-Chlorbenzaldehyd	6,0	52,4	53,5	56,9
	5 mM 2-Chlorbenzaldehyd	6,0	52,5	55,6	53,8
10	10 mM 2-Chlorbenzaldehyd	6,0	53,5	55,7	47,6

Beispiel 5: Langzeitlagerung:

Die Zellsuspension wurde auf pH 6,6 gestellt und anschließend mit
15 1,35 mM 2-Chlorbenzaldehyd versetzt und bei 4°C gelagert. Der Ver-
lauf der Aktivität ist in Fig. 2 wiedergegebenen.

20

25

30

35

40

45

Verfahren zur Konservierung und/oder Lagerung von Zellen mit Nitrilase oder Nitrilhydratase-Aktivität

5 Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Konservierung und/oder Lagerung von Mikroorganismen, die mindestens eine Nitrilhydratase- oder Nitrilase-Enzymaktivität aufweisen, wobei die Konservierung und/oder Lagerung in einem wässrigen Medium erfolgt, welches mindestens ein Aldehyd umfasst, wobei die Gesamtaldehydkonzentration in einem Bereich von 0,1 bis 100 mM/l liegt.

15

20

25

30

35

40

45

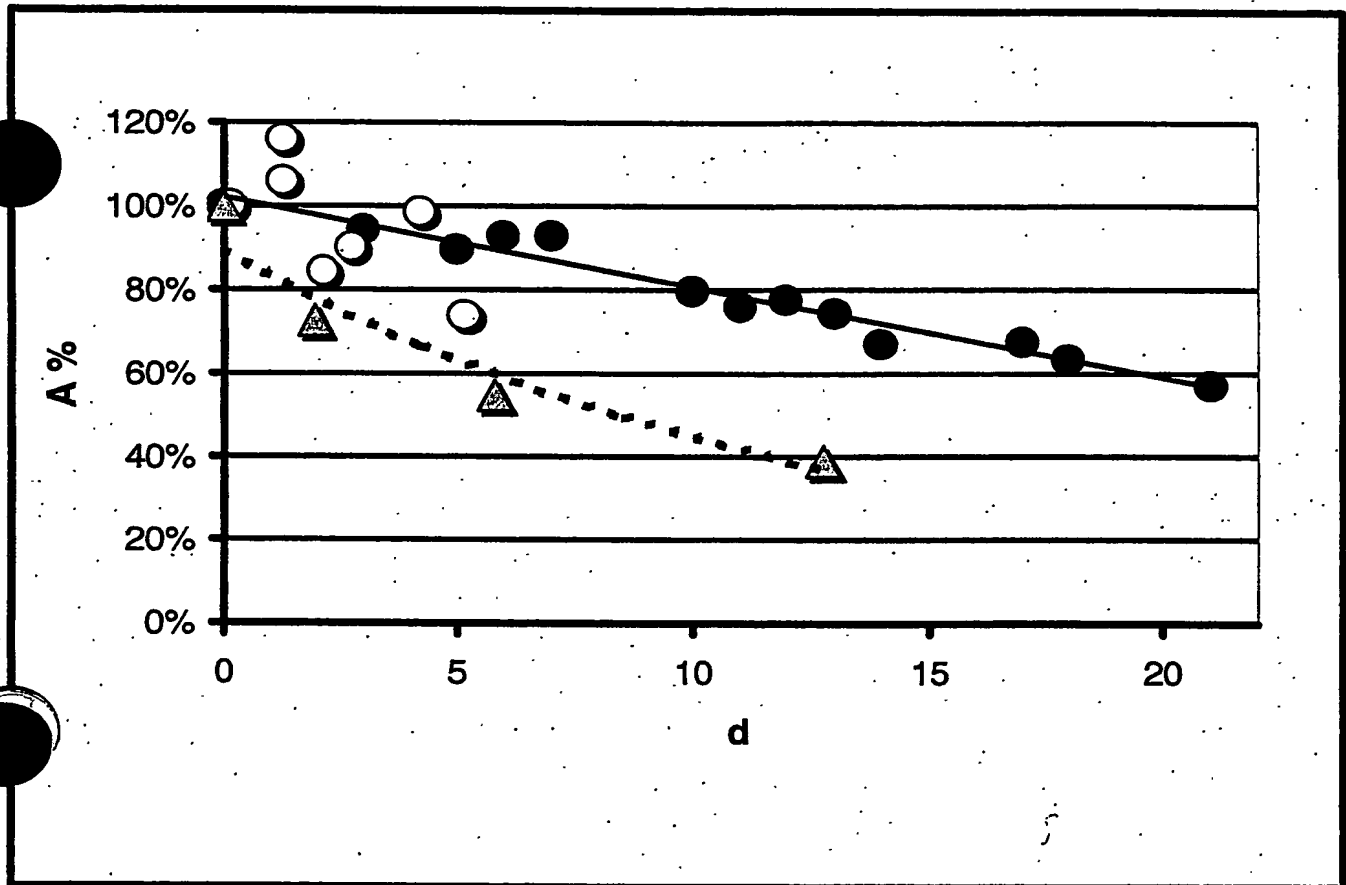


Fig. 1

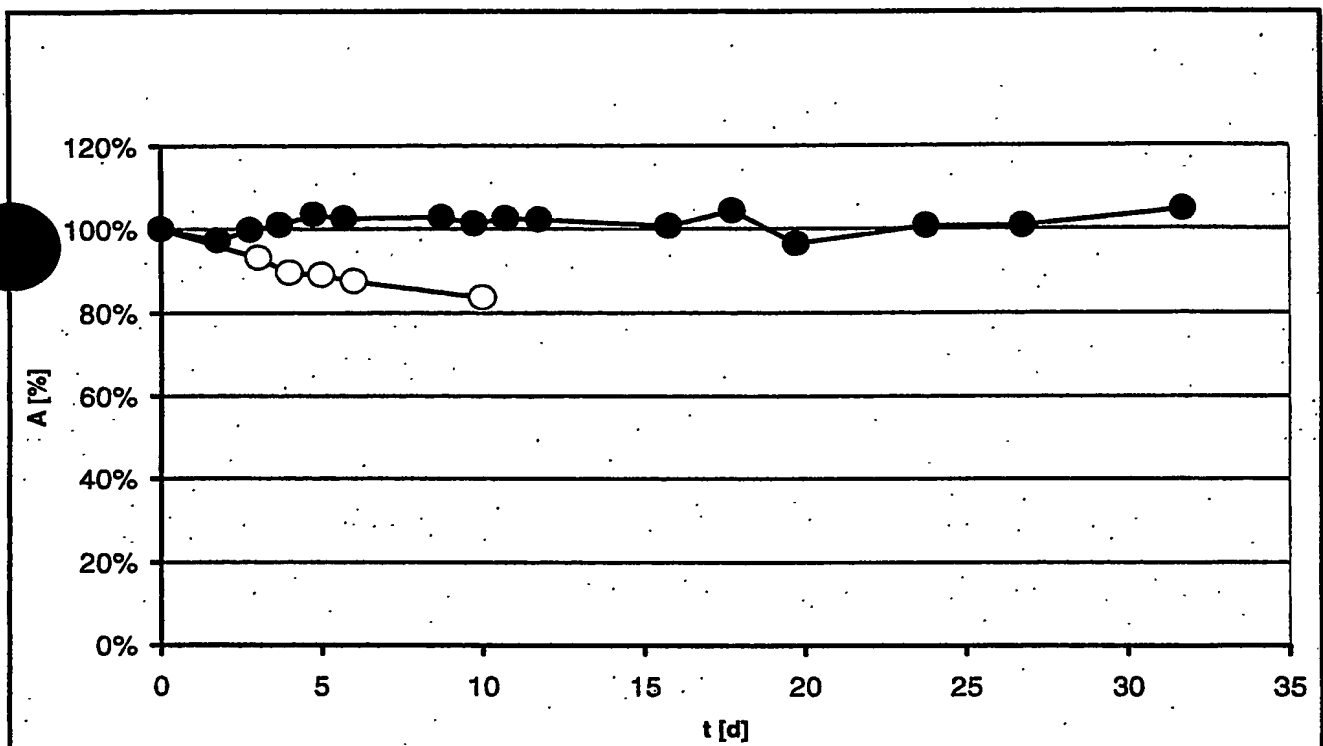


Fig. 2

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Verfahren zur Konservierung und/oder Lagerung von
Zellen mit Nitrilase oder Nitrilhydratase-Aktivität

<130> AE20020980

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1071

<212> DNA

<213> *Alcaligenes faecalis*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1068)

<223> coding for nitrilase

<400> 1

atg cag aca aga aaa atc gtc cgg gca gcc gcc gta cag gcc gcc tct	48
Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser	
1 5 10 15	
ccc aac tac gat ctg gca acg ggt gtt gat aaa acc att gag ctg gct	96
Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala	
20 25 30	
cgt cag gcc cgc gat gag ggc tgt gac ctg atc gtg ttt ggt gaa acc	144
Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu Thr	
35 40 45	
tgg ctg ccc gga tat ccc ttc cac gtc tgg ctg ggc gca ccg gcc tgg	192
Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala Trp	
50 55 60	
tcg ctg aaa tac agt gcc cgc tac tat gcc aac tcg ctc tcg ctg gac	240
Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu Asp	
65 70 75 80	
agt gca gag ttt caa cgc att gcc cag gcc gca cgg acc ttg ggt att	288
Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly Ile	
85 90 95	
ttc atc gca ctg ggt tat agc gag cgc agc ggc ggc agc ctt tac ctg	336
Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr Leu	
100 105 110	
ggc caa tgc ctg atc gac gac aag ggc gag atg ctg tgg tcg cgt cgc	384
Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Glu Met Leu Trp Ser Arg Arg	
115 120 125	
aaa ctc aaa ccc acg cat gta gag cgc acc gta ttt ggt gaa ggt tat	432
Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly Tyr	
130 135 140	
gcc cgt gat ctg att gtg tcc gac aca gaa ctg gga cgc gtc ggt gct	480
Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly Ala	
145 150 155 160	
cta tgc tgc tgg gag cat ttg tcg ccc ttg agc aag tac gcg ctg tac	528
Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu Tyr	
165 170 175	

2

tcc cag cat gaa gcc att cac att gct gcc tgg ccg tcg ttt tcg cta	576
Ser Gln His Glu Ala Ile His Ile Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser Leu	
180 185 190	
tac agc gaa cag gcc cac gcc ctc agt gcc aag gtg aac atg gct gcc	624
Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala Ala	
195 200 205	
tcg caa atc tat tcg gtt gaa ggc cag tgc ttt acc atc gcc gcc agc	672
Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala Ser	
210 215 220	
agt gtg gtc acc caa gag acg cta gac atg ctg gaa gtg ggt gaa cac	720
Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu His	
225 230 235 240	
aac gcc ccc ttg ctg aaa gtg ggc ggc ggc agt tcc atg att ttt gcg	768
Asn Ala Pro Leu Leu Lys Val Gly Gly Gly Ser Ser Met Ile Phe Ala	
245 250 255	
ccg gac gga cgc aca ctg gct ccc tac ctg cct cac gat gcc gag ggc	816
Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu Gly	
260 265 270	
ttg atc att gcc gat ctg aat atg gag gag att gcc ttc gcc aaa gcg	864
Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys Ala	
275 280 285	
atc aat gac ccc gta ggc cac tat tcc aaa ccc gag gcc acc cgt ctg	912
Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg Leu	
290 295 300	
gtg ctg gac ttg ggg cac cga gac ccc atg act cgg gtg cac tcc aaa	960
Val Leu Asp Leu Gly His Arg Asp Pro Met Thr Arg Val His Ser Lys	
305 310 315 320	
agc gtg acc agg gaa gag gct ccc gag caa ggt gtg caa agc aag att	1008
Ser Val Thr Arg Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile	
325 330 335	
gcc tca gtc gct atc agc cat cca cag gac tcg gac aca ctg cta gtg	1056
Ala Ser Val Ala Ile Ser His Pro Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu Val	
340 345 350	
caa gag ccg tct tga	1071
Gln Glu Pro Ser	
355	
<210> 2	
<211> 356	
<212> PRT	
<213> Alcaligenes faecalis	
<400> 2	
Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser	
1 5 10 15	
Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala	
20 25 30	
Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu Thr	
35 40 45	
Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala Trp	
50 55 60	
Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu Asp	
65 70 75 80	

3

Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly Ile
 85 90 95
 Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr Leu
 100 105 110
 Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Glu Met Leu Trp Ser Arg Arg
 115 120 125
 Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly Tyr
 130 135 140
 Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Gln His Glu Ala Ile His Ile Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser Leu
 180 185 190
 Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala Ala
 195 200 205
 Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala Ser
 210 215 220
 Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu His
 225 230 235 240
 Asn Ala Pro Leu Leu Lys Val Gly Gly Gly Ser Ser Met Ile Phe Ala
 245 250 255
 Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu Gly
 260 265 270
 Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys Ala
 275 280 285
 Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg Leu
 290 295 300
 Val Leu Asp Leu Gly His Arg Asp Pro Met Thr Arg Val His Ser Lys
 305 310 315 320
 Ser Val Thr Arg Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile
 325 330 335
 Ala Ser Val Ala Ile Ser His Pro Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu Val
 340 345 350
 Gln Glu Pro Ser
 355

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images problems checked, please do not report the problems to the IFW Image Problem Mailbox